

0014862-0

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2002 年 10 月 25 日
Application Date

申請案號：091125053
Application No.

申請人：許志模
Applicant(s)

局長

Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 6 月 18 日
Issue Date

發文字號：09220601770
Serial No.

申請日期	
案 號	
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 新型名稱	中 文	供微量反應之微陣列系統
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	1.許志猷 6.蔡旻龍 2.許宗雄 7.賴明聰 3.黃瑞星 8.潘永歷 4.吳見明 9.樊台清 5.陳達亨
	國 籍	均中華民國 ROC
三、申請人	住、居所	均新竹市光復路2段101號
	姓 名 (名稱)	許志猷
	國 籍	均中華民國 ROC
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	新竹市光復路2段101號

四、中文發明摘要(發明之名稱：供微量反應之微陣列系統)

本發明主要係提供一種微陣列系統及其使用方法，特別是用於供微量生物分子於反應液中反應，該系統包含一基板，該基板上具有用以承載該反應液之複數個微井；複數個微珠，其係置於該等反應液中，該等微珠之表面可供該生物分子附著於其上；及一震動模組，用以震動該基板，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應；視需要本發明之微陣列系統另附有一溫度控制模組，用以控制該反應液之溫度。利用本發明之微陣列系統進行生物分子之反應，具有高反應靈敏度、容易反應後處理、易於操作、訊號可信度增加、及可多次使用等多項優點。

英文發明摘要(發明之名稱：)

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

本案在向中華民國申請專利前，未曾向其他國家申請專利。

有關微生物已寄存於：

寄存日期：

，寄存號碼：

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係關於一種微陣列系統。

發明背景

「生物晶片」係指在一基材上，利用微電子、微機械等工業技術以製成可應用於生物化學分析之產品。目前因生物晶片具有分析速度快、樣品及試劑少、可獲得整體性(平行化)實驗數據之多種優點，成為研究基因、蛋白質、細胞及組織上的一大利器。

於各式生物晶片中，「去氧核糖核酸/蛋白質微陣列晶片」係將各種不同序列的去氧核糖核酸/蛋白質固定於一基板上作為探針。此晶片可以廣泛應用於基因圖譜分析、基因突變分析、大量基因表現之差異分析、藥物研發及疾病診斷等領域。然而，習用之微陣列晶片具有下列之缺點(1)偵測之靈敏度不佳，尤其是當應用在人類組織切片等微量檢體時特別明顯，其原因在於該等探針固定於一平面上，無法與檢體充份或均勻反應；(2)依所固定的探針種類，現有的微陣列晶片只能單獨針對去氧核糖核酸或蛋白質進行偵測；(3)成本高昂，因探針須經繁複的固定操作(如光罩法或印刷法)，始得以固定於該基板上，且每一晶片僅可進行單次檢測，故成本的考量一直是微陣列晶片無法廣泛應用之最大因素；(4)訊號可信度低，利用現有之微陣列晶片進行反應時，反應訊號係產生於基板平面上，當應用檢測系統如掃描器偵測訊號時，不易於基板上定位，且容易與背景值相混淆，造成訊號可信度低。

五、發明說明(2)

在生物晶片的發展中，不同於「微陣列晶片」，「生化反應晶片」係利用半導體製程、微機電等技術，將微量之樣品於一晶片中完成反應，如聚合酶連鎖反應晶片(PCR Chip)及毛細管電泳晶片。以聚合酶連鎖反應反應晶片為例，其係於一基板表面運用微細加工技術蝕刻出微井，並在其底部或反面製作溫度控制模組，藉以調控微井內的溫度。由於其體積小、表面積大，微井之溫度可迅速改變，因此，通常需數小時的聚合酶連鎖反應，於生化反應晶片上操作卻僅需數分鐘。但「生化反應晶片」亦有下列缺點：(1)依據不同的需求，不同的生化反應皆須設計不同的晶片，應用上較為不便；(2)由於在生化反應晶片上反應的反應液體積小，如需針對該反應液進行進一步處理(如純化)，則相當不易操作。

綜上所述，開發一種新微陣列系統改良上述缺點，乃為本發明所欲解決之課題。

發明概述

本發明係提供一種用以供微量之生物分子反應之微陣列系統，具有應用範圍廣、反應快、操作方便、易於處理等優點。

本發明之目的在於提供一種微陣列系統，其係用以供微量之生物分子於反應液中反應，該系統包含一基板，該基板上具有用以承載該反應液之複數個微井；複數個微珠，其係置於該等反應液中，該等微珠之表面可供該生物分子附著於其上；及一震動模組，用以震動該基板，俾使附著

五、發明說明 (3)

於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應；視需要本發明之微陣列系統包含一溫度控制模組，用以控制該反應液之溫度。

本發明之另一目的在於提供一種微量生物分子於反應液中反應之方法，其包含：

- (a) 提供複數個微珠；
- (b) 將該生物分子附著於該等微珠上；
- (c) 將(b)中附著有該生物分子之微珠置於該反應液中；
及
- (d) 將該反應液置入一基板上之複數個微井中以進行該生物反應；其中該基板可由一震動模組而震動，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應；視需要可另以一溫度控制模組以控制該微井中該反應液之溫度。

圖式簡要說明

本發明將以下列圖示進一步說明。

圖1表示本發明微陣列系統之部分剖面圖。

圖2表示本發明微陣列系統之控制電路板示意圖。

圖3表示利用本發明微陣列系統進行聚合酶連鎖反應合成TRAIL之產物電泳分析圖，其中1為以游離的T7及T3引子進行反應(對照組)；2為以游離的T7及固定在含有羧基之PolyScience磁珠上的T3引子進行反應；3為以游離的T7及固定在含有羧基之BANG's Laboratory磁珠上的T3引子進行反應；4為以游離的T3及固定在含有胺基PolyScience磁珠上的

五、發明說明(4)

T7引子進行反應；5為以游離的T3及固定在含有胺基BANG's Laboratory磁珠上的T7引子進行反應；6為以游離的T3及固定在含有胺基Dynal磁珠上的T7引子進行反應；及M為分子長度標準品。

圖4表示利用本發明微陣列系統進行去氧核糖核酸-去氧核糖核酸雜合反應螢光強度圖，其係以含Cy3之單股GAPDH片段作為目標物；其中PN表示使用PolyScience胺基磁珠；BN表示使用BANG's Laboratory胺基磁珠；DN表示使用Dynal胺基磁珠；a表示以固定有單股GAPDH片段之磁珠做為探針；b表示以固定有單股TRAIL片段之磁珠作為探針。

圖5表示於不同濃度之EDC作用下，於不同廠牌磁珠上固定HSA之量；圖5a中PL表示PolyScience胺基磁珠；BN表示BANG's Laboratory胺基磁珠；DN表示Dynal胺基磁珠；圖5b中PL表示PolyScience羧基磁珠；及BN表示BANG's Laboratory羧基磁珠。

圖6表示以螢光標記蛋白質之蛋白質量與螢光強度關係圖；圖6a係十倍序列稀釋之HSA或anti-HSA抗體之螢光強度圖；圖6b則為分別以Cy3及Cy5標定anti-HSA抗體之蛋白質含量與螢光強度關係圖，其中Cy3-Ab表示以Cy3標示抗體，且Cy5-Ab表示以Cy5標示抗體；及圖6c則為分別以Cy3及Cy5標定HSA蛋白質含量與螢光強度關係圖，其中Cy3Ag表示以Cy3標示抗原，且Cy5Ag表示以Cy5標示抗原。

圖7表示以固定於磁珠上之1 mg HSA為探針，並以螢光

五、發明說明(5)

標記 anti-HSA 抗體為目標進行雜合反應之結果；圖 7a 係將十倍序列稀釋之雜合反應之螢光強度圖；圖 7b 則為加入之抗體含量與螢光強度關係圖，該反應液係點於玻片上進行掃描；圖 7c 為以 1.6 μ g 抗體反應之螢光強度圖，該訊號係由掃描器直接掃描微井中之訊號所得，其中 Blank 表示空白玻片；Control 1 表示固定於磁珠上之 HSA；Control 2 表示以螢光標示之 anti-HSA 抗體；+Ab 表示雜合反應之結果。

圖 8 表示以固定於磁珠上之 1 mg anti-HSA 抗體為探針，並以螢光標記 HSA 抗原為目標進行雜合反應之結果；圖 8a 係十倍序列稀釋之雜合反應之螢光強度圖；圖 8b 則為加入之 HSA 含量與螢光強度關係圖，其中 Blank 表示空白玻片；Control 1 表示固定於磁珠上之 anti-HSA 抗體；Control 2 表示以螢光標示之 HSA；+Ab 表示雜合反應之結果。

圖 9 表示以固定於磁珠上之 TATA 引子為探針，並以螢光標記之核蛋白為目標進行雜合反應之結果；圖 9a 中係十倍稀釋之雜合反應蛋白質之螢光強度圖；圖 9b 則為雜合反應結果之螢光強度關係圖，該反應液係點於玻片上進行掃描；圖 9c 為雜合反應結果之螢光強度關係圖，該訊號係由掃描器直接掃描微井中之訊號所得，其中 1 為固定於磁珠上之探針；2 為固定於磁珠上之探針與以螢光劑標定之核蛋白進行雜合反應；3 為固定於磁珠上之探針與先以 1 X 之游離探針進行競爭反應過後之螢光劑標定之核蛋白進行雜合反應；及 4 為固定於磁珠上之探針與先以 2 X 之游離探針進行競爭反應過後之螢光劑標定之核蛋白進行雜合反應。

五、發明說明(6)

元件符號說明

- 1 表示基板
- 11 表示微井
- 2 表示微珠
- 3 表示反應液
- 41 表示靜電式微震動器
- 42 表示震動器電路
- 51 表示加熱/感測電阻
- 52 表示熱電冷卻器
- 53 表示溫度感應器電路
- 54 表示加熱器電路
- 55 表示冷卻器電路
- 6 表示覆蓋板
- 61 表示封邊
- 7 表示金屬封裝半球
- 8 表示控制電路板
- 9 表示雷射源
- 91 表示微透鏡

發明詳細說明

本發明係利用微珠及生化反應晶片的結合，而開發出具有反應靈敏度高、易於操作、及可多次使用等多項優點之微陣列系統。

本發明之微陣列系統係用以供微量之生物分子於反應液中反應，該系統包含一基板，該基板上具有用以承載該反

五、發明說明(7)

應液之複數個微井；複數個微珠，其係置於該等反應液中，該等微珠之表面可供該生物分子附著於其上；及一震動模組，用以震動該基板，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應。視需要，本發明之微陣列系統另包含一溫度控制模組，用以控制該微井中該反應液之溫度。

根據本發明之一具體實施例，本發明之微陣列系統(參看圖1)，包含(1)一基板1，該基板1上具有用以承載反應液3之複數個微井11；(2)複數個微珠2，置於該等反應液3中，該等微珠2之表面可供該生物分子附著於其上；(3)一震動模組(如41)，用以震動該基板11；及(4)一溫度控制模組(如51)，用以控制該微井11中該反應液3之溫度。

本文所使用之「生物分子」乙辭係指參與生物反應之分子，包含(但不限於)核酸、胜肽、蛋白質及醣類之巨分子。適用於本發明微陣列系統之生物反應為該等生物分子所參與之反應，其包含(但不限於)聚合酶連鎖反應、核酸雜合反應、蛋白質雜合反應及核酸-蛋白質雜合反應；特別是需精密溫度控制，或需將該生物分子自反應液中分離之反應。

根據本發明之一具體實施例，該微陣列系統可用於進行雜合反應，如核酸雜合反應、蛋白質雜合反應或核酸-蛋白質雜合反應。該等雜合反應係由一生物分子作為探針(可為核酸或蛋白質)與一目標物之結合，而顯現出可偵測之訊號。該探針與目標物之結合包含鹼基間之配對、蛋白質與

五、發明說明(8)

蛋白質間之交互作用、核酸與蛋白質間之交互作用、或是生物分子間之交互作用。該等結合通常需於適當反應條件下進行(如適當的溫度、離子濃度、酸鹼度等)。當反應結束時，可利用物理方法(如改變溫度)或化學方法(如改變酸鹼值及離子濃度)改變反應條件，使該等結合消失，並使作為探針之生物分子與目標物分離，即可再使用該探針，故根據本發明之微陣列系統具有可重複使用之優點。

本文中所使用之「基板」乙辭為一支撐物，其上有複數個微井，並供附以溫度控制模組及震動模組。其相對於本發明之生物分子反應為不具生物反應活性者，如由矽材質製成。位於該基板上之複數個微井可以業界習用之方法形成，以矽基板而言，可以微影技術定位並以蝕刻方式完成，而蝕刻之方法包含但不限於以氫氧化鉀溶液進行或以感應耦合電漿方式進行。該等微井之體積及數量可視所欲進行反應之體積及所欲同時進行之反應數而定。

本發明所言之「微珠」係指表面可供生物分子附著，或經適當之活化作用後可附著之小珠。較佳地，該微珠可輕易自該反應液中分離，俾以達到將固定於其上之該生物分子自該反應液中分離之目的，在一具體實施例中，該微珠為一磁珠，其可藉磁力之作用達到分離之目的。該微珠可利用熟習該項技術者所熟知任何方法處理，使該生物分子得以附著於該微珠表面上；例如先處理微珠表面使其具有羧基，以供與具胺基之生物分子形成醯胺鍵，或處理微珠表面胺基，以供與具羧基之生物分子形成醯胺鍵而固定。

五、發明說明(9)

根據本發明之一具體實施例，活化該微珠之方法可以偶合劑，如1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳二醯胺鹽酸鹽[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride，EDC]活化處理該微珠之表面，使其可與該生物分子相結合。

本文所使用之「震動模組」乙辭係用以震動該基板，使位於該等微井內之該等微珠可於該反應液中充份且均勻反應之裝置。參看圖1及圖2，於本發明之一具體實施例中，該震動模組包含位於該基板1下方之一靜電式微震動器41及一震動器電路42，其中該靜電式微震動器41為熟習該項技術者可由兩金屬平行板以微機電(MEMS)技術製成，及該震動器電路42可由互補式金氧半(CMOS)製程製成。

本文所使用之「溫度控制模組」乙辭係指可控制該微井中反應液溫度之裝置，如圖1及圖2所示之本發明具體實施例，該溫度控制模組包含一用於檢測該反應液3溫度之溫度感應器，並由一溫度感應器電路53所控制；一用於提高該反應液3溫度之加熱器，且以一加熱器電路54所控制；及一用於降低該反應液3溫度之冷卻器，例如一位於該基板11下方之熱電冷卻器52，並由一冷卻器電路所控制55。在本發明之一具體實施例中，該溫度感應器與該加熱器可結合於一加熱/感測電阻51中；該溫度感應器51、加熱器51及冷卻器52之製作係熟習該項技術者可以微機電技術製作，如以硼擴散方式於該等微井11之下方製成加熱/感測電阻51；該溫度感應器電路53、加熱器電路54及冷卻器電路55則可由

五、發明說明 (10)

互補式金氧半製程製成。該等電路53、54、55可以金屬封裝半球7與該加熱/感測電阻51及熱電冷卻器52連結，且該等金屬封裝半球7亦可提供該熱電冷卻器42與該基板1間之熱傳導層。該溫度控制模組係用於控制該生物分子反應之溫度，其可藉該溫度感應器檢測出該反應液3之溫度，並控制啟動該加熱器51或冷卻器52，以調節該反應液3之溫度至所欲之溫度。因該反應液3之體積微小，利用該溫度控制模組可迅速達到升溫或降溫之效果，而加快反應，縮短反應時間並增加反應穩定度。溫度控制模組中之電路53、54、55與該震動器電路42可整合於一控制電路板8上。

視需要，若該生物分子反應需雷射激發反應，本發明之微陣列系統可另包含一雷射源9，且較佳係亦包含一微透鏡91。該雷射源9經該微透鏡91之微調，可準確聚焦於該微井11之範圍內。

根據本發明之一具體實施例，該微陣列系統可另包含一訊號偵測器，其可分別偵測該等微井11中產生之訊號，例如該訊號感測器包含一掃描器，並將訊號傳送至一訊號處理器，以供進一步分析。

於本發明之一具體實施，微陣列系統可另包含一覆蓋板6，其係由封邊61固定於該基板1上。該覆蓋板6係用以防止該反應液3於反應過程中（特別是加熱反應中）之揮發現象造成反應液中成分的不穩定。例如該覆蓋板6為一7740玻璃蓋，且該封邊61為聚亞烯胺封邊。

本發明另提供一種微量生物分子於反應液中反應之方

五、發明說明(11)

法，其包含：

- (a) 提供複數個微珠；
- (b) 將該生物分子附著於該等微珠上；
- (c) 將(b)中附著有該生物分子之微珠置於該反應液中；
及
- (d) 將該反應液置入一基板上之複數個微井中以進行該生物反應；其中該基板可由一震動模組而震動，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應；視需要可另以一溫度控制模組以控制該微井中該反應液之溫度。

本發明之微陣列系統及反應方法具有下列優點：(1)易於操作，依據本發明，生物分子附著於微珠上之操作方式遠較習用微陣列晶片將探針固定於基板上之方法簡單，僅需單一步驟即可完成，大幅減低操作成本；(2)靈敏度高，根據本發明，附著於微珠上之生物分子在震動模組之作用下，可均勻且充份地在反應液中進行反應，與習用將探針固定於一基板平面上之技術相較，提供較佳之靈敏度；(3)應用範圍廣泛，可適用於不同的生物分子，如核酸、蛋白質或醣類分子，如依習用技術必須分別製備不同晶片及不同系統。本發明之微陣列系統及方法則可適用於各式之生物分子反應，僅需將待測之生物分子附著於微珠上即可；(4)增加訊號可信度，根據本發明之生物分子反應係於微井中進行，於訊號判讀時可清楚界定訊號區域（即微井內）及背景區域，並藉微井定位檢測訊號，檢測結果之可信度

五、發明說明 (12)

隨之提高；(5)易於處理反應後之生物分子，因生物分子係附著於微珠上，且本發明之較佳實施例為該等微珠可輕易自該反應液中分離，故反應後之生物分子即可與微珠一起自反應液中分離；及(6)可重複使用，根據本發明，於進行雜合反應時，固定於微珠上作為探針的生物分子在反應完成後，利用以物理或化學之方法可使該探針與目標物分離，故本微陣列系統即可再使用。

茲以下列實例予以詳細說明本發明，惟並不意味本發明僅侷限於此等實例所揭示之內容。

實例1：微陣列系統

參看圖1及圖2，本實例之微陣列系統包含一基板1，該基板1上具有複數個微井11；複數個微珠2；一靜電式微震動器41、一加熱/感測電阻51、一熱電冷卻器52，並分別由整合於一控制電路板8上之一震動器電路42、一溫度感應器電路53及加熱器電路54、一冷卻器電路55所控制；複數個金屬封裝半球7；及以聚亞烯銨封邊61固定之一7740玻璃蓋覆蓋板6。

實例2：聚合酶連鎖反應

引子之固定

先以0.2M之2-(N-嗎福啉基)乙基磺酸[2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, MES](pH5.0)緩衝液清洗分別具有胺基或具羧基磁珠之表面，本實例中所用之磁珠係分別購自PolyScience、BANG's Laboratory與Dynal等廠牌。

將T3或T7引子經化學修飾後使其5'端分別帶有羧基或胺

五、發明說明 (13)

基。

取10mg清洗過之磁珠、200 μ g修飾過後之引子及0.05M之1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳二醯胺鹽酸鹽(EDC)於室溫下均勻搖晃60分鐘，再以磁鐵吸住磁珠而移除EDC液，並以清洗緩衝液(20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH7.5, 0.5% Tween 20)清洗兩次後，再儲存於保存緩衝液[20 mM NaH_2PO_4 pH7.5, 0.1 %w/v 牛血清蛋白(BSA), 0.02 % 疊氮化鈉]中，控制磁珠濃度為20 mg/mL。

聚合酶連鎖反應

以清水將固定於磁珠上之T3或T7引子沖洗兩次，且該固定於磁珠上之T3或T7引子及游離之T7及T3引子，分別以TNF相關細胞凋亡刺激配體基因[TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)]及磷酸甘油醛脫氫酶基因[glyceraldehydes phosphate dehydrogenase (GAPDH)]之基因表現標記(EST)質體作為模版，進行聚合酶連鎖反應。50 μ L之反應混合物為0.5 μ L之模版、固定於磁珠上之T3及游離之T7或固定於磁珠上之T7及游離之T3引子各500nM、dNTP各250 μ M、1U之Taq 聚合酶(購自Finnzymes, Fin, Espoo)、1.0 mM之Tris-HCl、1.5 mM之氯化鎂、150 mM之氯化鉀、及0.1 %之Triton X-100。

先將上述包含磁珠之反應混合液置於實例1之微井中，並利用溫度控制模組控制溫度為：95 $^{\circ}\text{C}$ 3分鐘，再95 $^{\circ}\text{C}$ 30秒、55 $^{\circ}\text{C}$ 40秒及72 $^{\circ}\text{C}$ 1分鐘循環35次，再於72 $^{\circ}\text{C}$ 5分鐘。

五、發明說明 (14)

在反應過程中並以靜電式微震動器震動該反應混合液。

另將以游離之T3及T7引子於相同實驗條件下，以習用之聚合酶連鎖反應儀進行反應作為對照組。

結果

將以TRAIL基因表現標記質體作為模版之反應產物利用1%瓊脂凝膠進行電泳分析，其結果如圖3所示。除使用固定於PolyScience胺基磁珠上之T7引子與游離之T3引子(參看圖3之4行)未生產出TRAIL基因片段外，其餘之反應皆可產得所欲之去氧核糖核酸片段。

實例3：去氧核糖核酸-去氧核糖核酸雜合反應

探針之製備

含 TRAIL 或 GAPDH 去氧核糖核酸片段之磁珠係依實例 2 之聚合酶連鎖反應方法製備，所採用之磁珠為 PolyScience 胺基磁珠、BANG's Laboratory 胺基磁珠與 Dynal 胺基磁珠，再將該等含去氧核糖核酸之磁珠加熱至 95℃ 以製得含單股去氧核糖核酸之磁珠，即為本雜合反應之探針。

目標物之製備

以游離之 T3 及 T7 引子及以 GAPDH 之基因表現標記質體作為模版，於與實例 2 中之條件利用習用之聚合酶連鎖反應儀進行合成，唯其中以 Cy3-dUTP(購自 AP Biotech, Uppsala, Sweden)取代 50%之 dTTP 以製得含螢光標記之去氧核糖核酸片段。分別將此等片段加熱至 95℃ 以製得含單股去氧核糖核酸之目標物。

雜合反應

五、發明說明 (15)

本實例中之雜合反應液為6 X沙林-檸檬酸鈉溶液 (Saline-Sodium Citrate, SSC)、0.5%硫酸十二酯鈉(SDS)、及5 X Denhard's溶液[0.1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin)、0.1% Ficoll、0.1%聚乙 烯吡咯烷(polyvinylpyrrolidone)]。本實例之目標物取50 ng具Cy3螢光標記之單股GAPDH去氧核糖核酸片段，並分別加入2 μ L之固定有TRAIL或GAPDH之單股片段之20mg/mL磁珠於該雜合反應液中，並加入如實例1所示微陣列系統之微井中，並於靜電式微震動器震動作用下於65 $^{\circ}$ C反應5小時。接著以磁鐵吸出磁珠，並以清洗緩衝液(0.1% SSC、0.5% SDS)於室溫下清洗兩次。

訊號偵測及結果

將反應後之反應液點於一玻片上，並以Axon掃描器偵測螢光訊號，並以ScanAlyze分析螢光訊號影像(<http://www.microarrays.org/software>)，其結果如圖4所示。

於以單股GAPDH為探針(圖4中之a組)之雜合反應中，PolyScience胺基磁珠及Dynal胺基磁珠皆可明顯觀察到螢光訊號，但BANG's Laboratory胺基磁珠之效果較差，且於以單股TRAIL為探針(圖4之b組)之對照組實驗中，三種磁珠所觀察得之訊號皆相當低，可知由本發明微陣列系統所進行之去氧核糖核酸-去氧核糖核酸雜合實驗具有高度專一性，且有靈敏度高之特性。

實例4：蛋白質-蛋白質雜合反應

蛋白質探針之製備

五、發明說明 (16)

先以0.2M之MES(pH5.0)緩衝液清洗表面分別帶具有胺基或具羧基之磁珠10 μ L，本實例中所用之磁珠係分別購自PolyScience、BANG's Laboratory與Dynal等廠牌。取處理過之磁珠、20 μ g之人類血清白蛋白(HSA)或抗人類血清白蛋白(anti-HSA)抗體及分別以0、50、100及200 mM之EDC於室溫下均勻搖晃30分鐘，再以磁鐵吸住磁珠而移除EDC液，並加入50 mM之甘胺酸阻斷緩衝液(pH5.0)於室溫下均勻搖晃15分鐘，再以1M之氯化鈉溶液清洗兩次，再以10mM Tris-HCl(pH8.0)清洗一次後，儲存於10 μ L之Tris-HCl(pH8.0)中。

本實例中以BCA assay(Sigma)方式測量於不同EDC濃度處理下，固定於不同廠牌磁珠之HSA蛋白質量。圖5a表示於PolyScience、BANG's Laboratory及Dynal胺基磁珠上固定HSA之量，圖5b表示於PolyScience及BANG's Laboratory羧基磁珠上固定HSA之量。

目標蛋白質之製備

以將HSA或anti-HSA目標蛋白質置於0.1 M碳酸鈉pH8.0緩衝液中，並與經NHS-ester溶液活化之Cy3或Cy5螢光染劑溶液(購自Amersham catalog# PA23001及PA25001)混合，使最終之蛋白質濃度為2 mg/mL且螢光染劑之濃度為300 μ M，並於室溫下避光反應45分鐘，並以1M Tris-HCl pH8.0終止反應。再以離心方式去除未與蛋白質結合之染劑，並調整蛋白質濃度為2 mg/mL。接著分析蛋白質量與螢光檢測量之關係，其結果參看圖6，a係將十倍稀釋之蛋

五、發明說明 (17)

白質點於以聚-L-離胺酸包覆之玻片上，並進行螢光強度掃描，並以GenePix分析，b與c則為分別以Cy3及Cy5標定anti-HSA抗體及HSA之結果，其可知螢光量與蛋白質之量係大致呈線性關係。

雜合反應

將固定於磁珠上之蛋白質探針置於如實例1所示微陣列系統之微井中，加入3%脫脂牛奶TTBS溶液(20 mM Tris-HCl pH 7.4、0.5 M NaCl、0.5% Tween 20)進行阻斷1小時，並以TTBS溶液清洗兩次後加入不同濃度之以螢光標記之目標蛋白質，並於37 °C進行1小時，再移除上清液，並以不含牛奶之TTBS溶液清洗三次，再將磁珠存放於0.1 M之Tris緩衝液中，以進行螢光分析，其中上述反應均於靜電式微震動器震動作用下進行。

訊號偵測及結果

以固定於磁珠上之1 mg HSA為探針，並以螢光標記anti-HSA抗體為目標進行雜合反應之結果示於圖7，其中圖7b係將反應液點於一玻片上，並以Axon掃描器掃描，圖7c則直接以一掃描器偵測微井中反應液之螢光訊號，並皆以ScanAlyze分析螢光訊號影像。而以固定於磁珠上之1 mg anti-HSA抗體為探針，並以螢光標記HSA為目標進行雜合反應之結果示於圖8。

參看圖7，其中隨著抗體的量增加，可偵測得之螢光強度亦增加，且彼此成良好之線性關係，可知本發明微陣列系統之靈敏度及專一性極佳；但圖8中，抗體探針及目標抗原

五、發明說明 (18)

間並無法明顯之相關，其可能導因於固定大分子抗體於磁珠上之效果較差。

實例5：雙股去氧核糖核酸-蛋白質雜合反應

雙股去氧核糖核酸探針之製備

本實例中雙股去氧核糖核酸探針之製備方法為與實例2中引子的固定方法相似，其中用於固定之引子為TATA引子：5'-CCTACCTCATTTTATATgCTCTgC-3'。

目標蛋白質之製備

本實例中目標蛋白質為將人類非小型人類肺癌細胞H460(human non-small lung cancer cell H460)之核蛋白萃取出，並以類似於實例4目標蛋白質之製備方法標定。

雜合反應

此雜合反應係於總體積為20 μ L之結合溶液[15 mM N-(2-羥乙基)哌嗪-N-(2-乙基磺酸)(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid)，HEPES] Ph 7.9、100mM KCl、3mM MgCl₂、1mM EDTA、0.5mM DTT、10%甘油及2 mg poly(dI-dC))中進行，其中固定於磁珠上之TATA引子先以3 %脫脂牛奶TTBS溶液於37 $^{\circ}$ C進行阻斷1小時，並以TTBS溶液清洗兩次後加入不同濃度之以螢光標記之目標蛋白質，並於室溫進行20分鐘，再移除上清液，並以不含牛奶之TTBS溶液清洗三次，再將磁珠存放於0.1 M之Tris緩衝液中，以進行螢光分析，本實例亦加入競爭實驗，其係先將目標蛋白質與游離之引子探針作用10分鐘後，方與固定於磁珠上之探針作用，其中上述反應係如

五、發明說明 (19)

實例1所示之微陣列系統且於靜電式微震動器震動作用下進行。

訊號偵測及結果

訊號偵測及分析之結果示於圖9，其中圖9b係將反應液點於一玻片上，並以Axon掃描器掃描，圖9c則直接以一掃描器偵測微井中反應液之螢光訊號，並皆以ScanAlyze分析螢光訊號影像。其中隨著競爭探針的增加，螢光強度相對減弱，可知本發明之微陣列系統亦可應用於去氧核糖核酸-蛋白質雜合反應中。

上述實施例僅為說明本發明之原理及其功效，而非限制本發明。因此，習於此技術之人士對上述實施例所做之修改及變化仍不違背本發明之精神。本發明之權利範圍應如後述之申請專利範圍所列。

六、申請專利範圍

1. 一種微陣列系統，用以供微量之生物分子於反應液中反應，其包含：
 - 一基板，該基板上具有複數個微井，該等微井係用以承載該反應液；
 - 複數個微珠，其係置於該等反應液中，該等微珠之表面可供該生物分子附著於其上；及
 - 一震動模組，用以震動該基板，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應。
2. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該生物分子係選自由核酸、胜肽及醣類分子所組成之群。
3. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該生物分子反應係選自由聚合酶連鎖反應、核酸雜合反應、蛋白質雜合反應及核酸-蛋白質雜合反應所組成之群。
4. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該基板係為一矽基板。
5. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該等微珠係為磁珠。
6. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該等微珠係以偶合劑活化，以供生物分子固定於其上。
7. 根據申請專利範圍第6項之微陣列系統，其中該偶合劑為1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳二醯胺鹽酸鹽。
8. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該震動模組係位於該基板之下方。
9. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，其中該震動模

六、申請專利範圍

- 組包含一靜電式微震動器。
10. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，另包含一溫度控制模組，用以控制該微井中該反應液之溫度。
 11. 根據申請專利範圍第10項之微陣列系統，其中該溫度控制模組包含一溫度感應器、一加熱器及一冷卻器。
 12. 根據申請專利範圍第11項之微陣列系統，其中該溫度感應器及該加熱器為一加熱/感測電阻。
 13. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，另包含一雷射源。
 14. 根據申請專利範圍第13項之微陣列系統，另包含一微透鏡。
 15. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，另包含一覆蓋板。
 16. 根據申請專利範圍第1項之微陣列系統，另包含一訊號感測器。
 17. 一種微量生物分子於反應液中反應之方法，其包含：
 - (a) 提供複數個微珠；
 - (b) 將該生物分子附著於該等微珠上；
 - (c) 將(b)中附著有該生物分子之微珠置於該反應液中；及
 - (d) 將該反應液置入一基板上之複數個微井中以進行該生物反應，其中該基板可由一震動模組而震動，俾使附著於該等微珠上之該生物分子可於該反應液中均勻反應。

六、申請專利範圍

18. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該生物分子係選自由核酸、胜肽及醣類分子所組成之群。
19. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該生物分子反應係選自由聚合酶連鎖反應、核酸雜合反應、蛋白質雜合反應及核酸-蛋白質雜合反應所組成之群。
20. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該基板係為一矽基板。
21. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中(a)中之該等微珠係為磁珠。
22. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中步驟(b)係以偶合劑活化該等微珠，以供生物分子固定於其上。
23. 根據申請專利範圍第22項之方法，其中偶合劑為1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳二醯胺鹽酸鹽。
24. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該震動模組係位於該基板下方。
25. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該震動模組包含一靜電式微震動器。
26. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該基板以一溫度控制模組以控制該微井中該反應液之溫度。
27. 根據申請專利範圍第26項之方法，其中該溫度控制模組包含一溫度感應器、一加熱器及一冷卻器。
28. 根據申請專利範圍第27項之方法，其中該溫度感應器及該加熱器為一加熱/感測電阻。
29. 根據申請專利範圍第17項之方法，另包含以一雷射源

六、申請專利範圍

激發該反應液。

30. 根據申請專利範圍第29項之方法，另包含以一微透鏡調整該雷射源。
31. 根據申請專利範圍第17項之方法，於反應進行中另施予一覆蓋板。
32. 根據申請專利範圍第17項之方法，另包含以一訊號感測器檢測反應之進行。

裝

訂

線

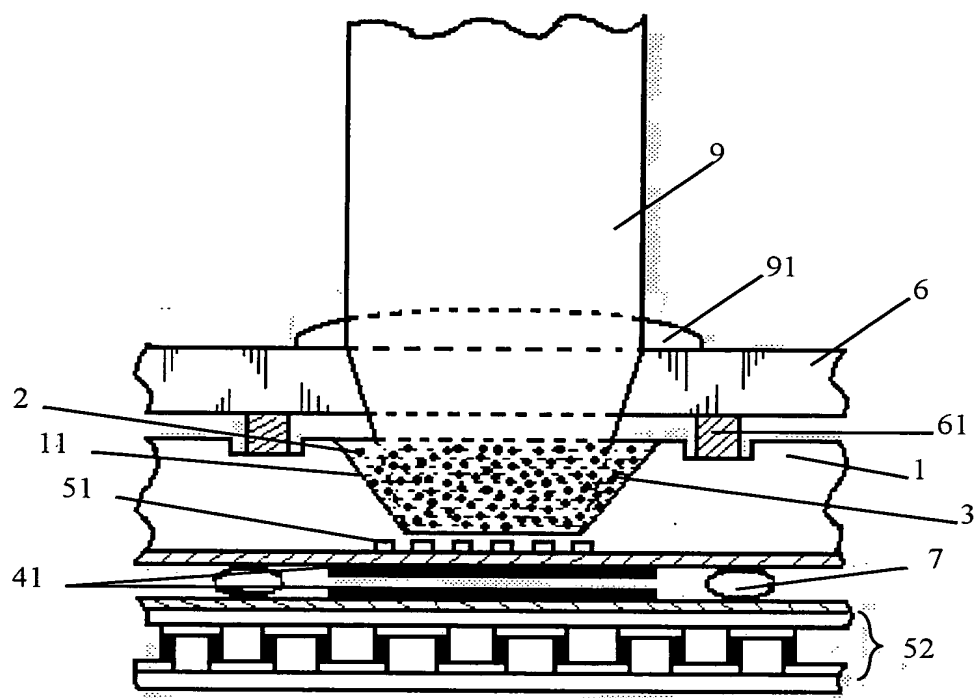


圖 1

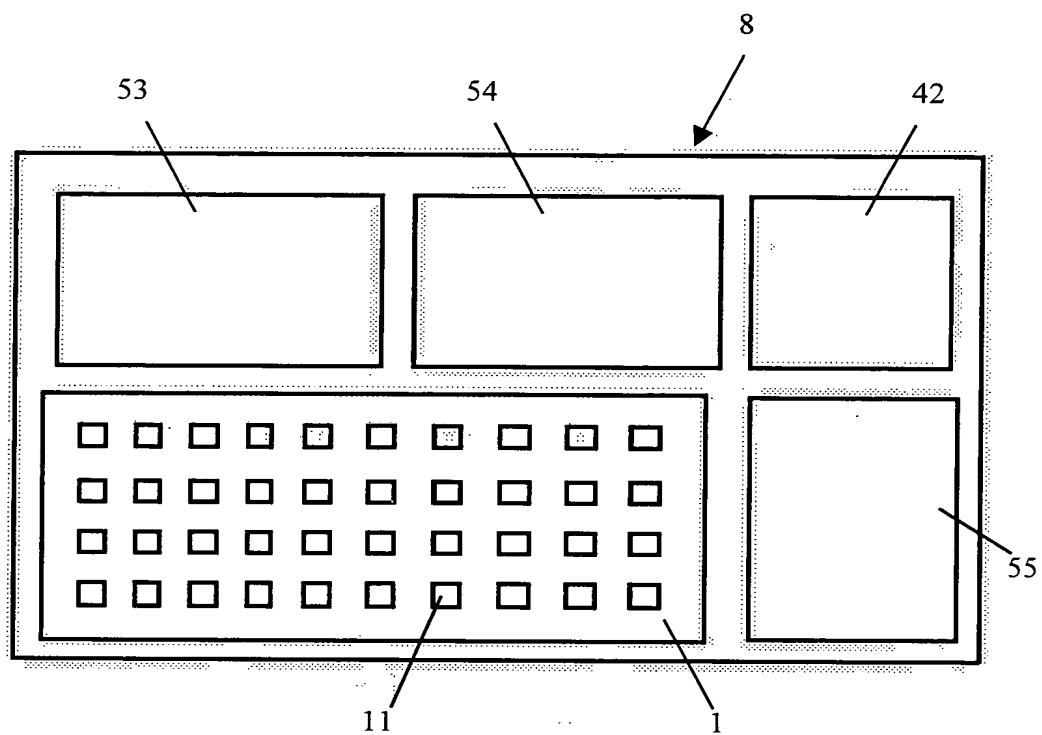


圖 2

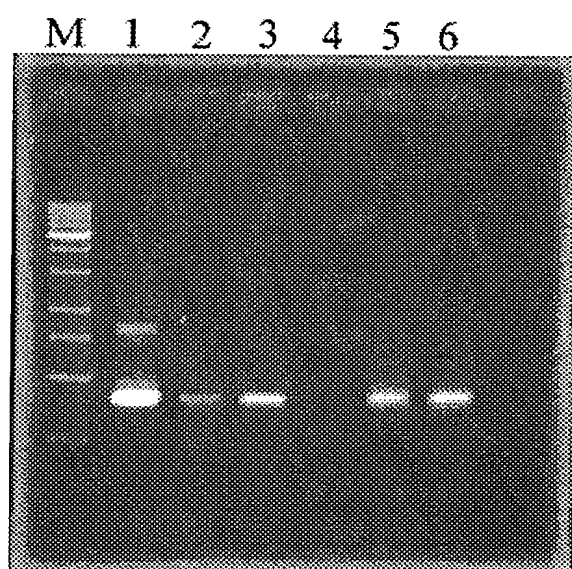


圖 3

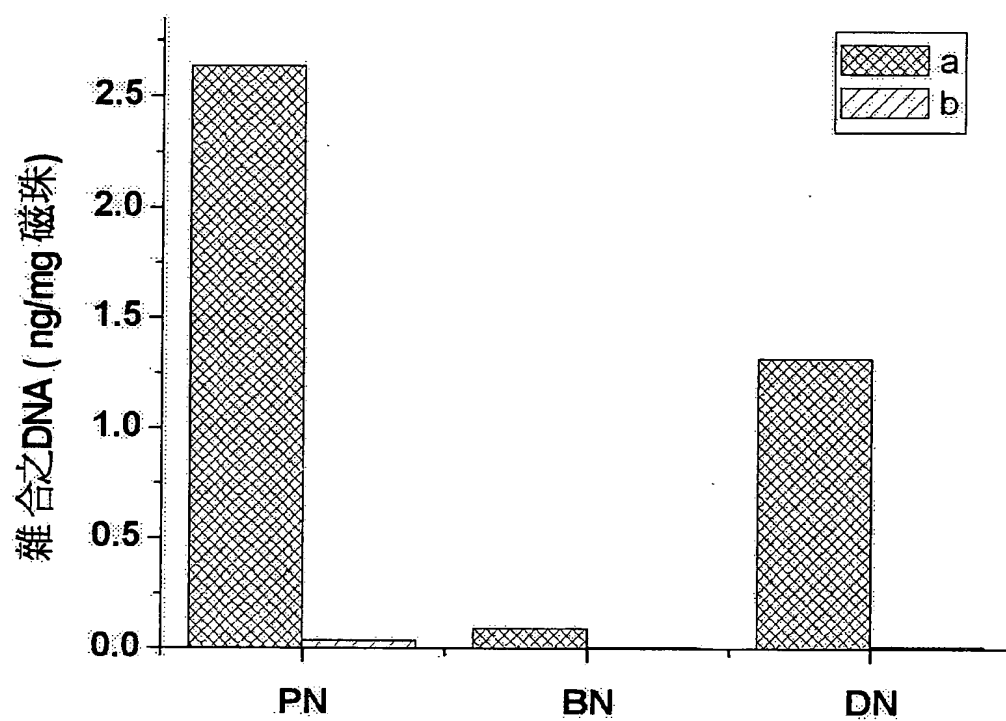


圖 4

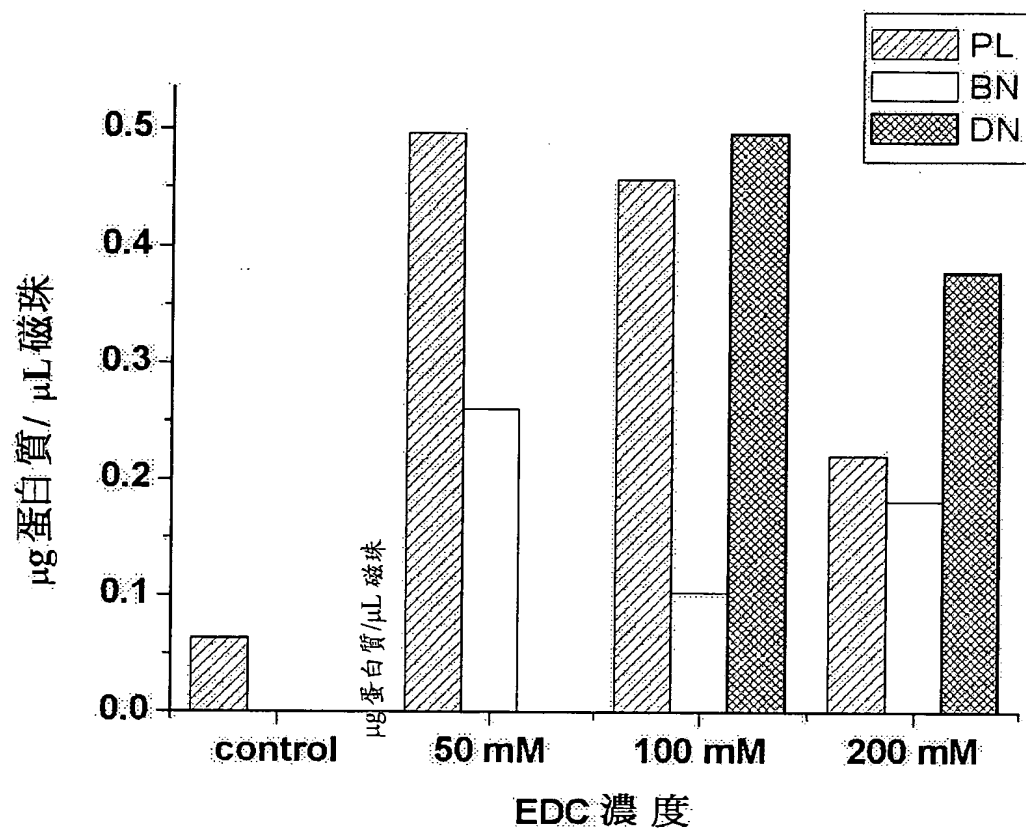


圖 5a

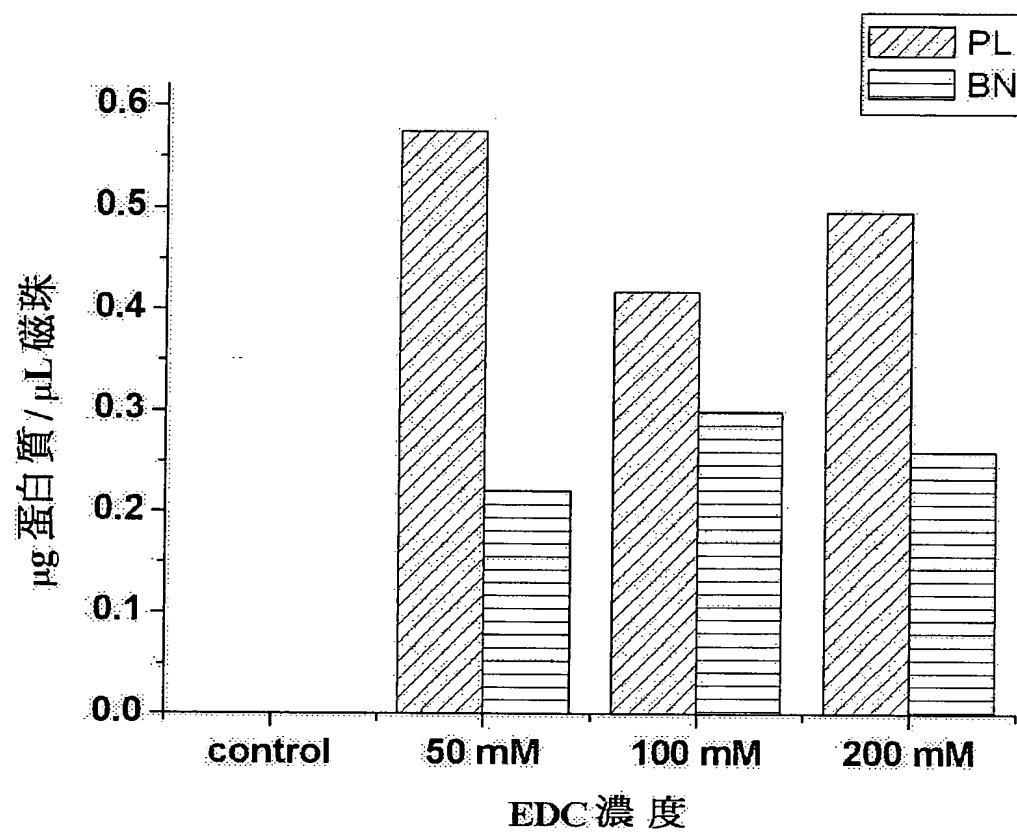


圖 5b

HSA

Anti-HSA

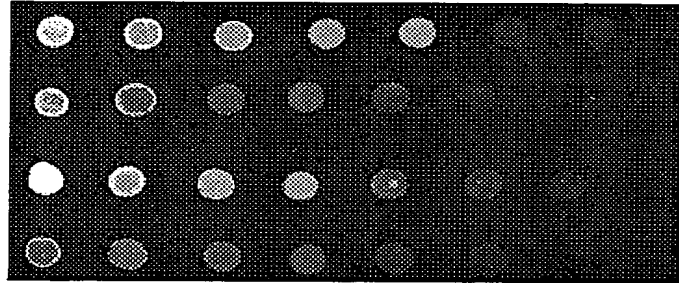


圖 6a

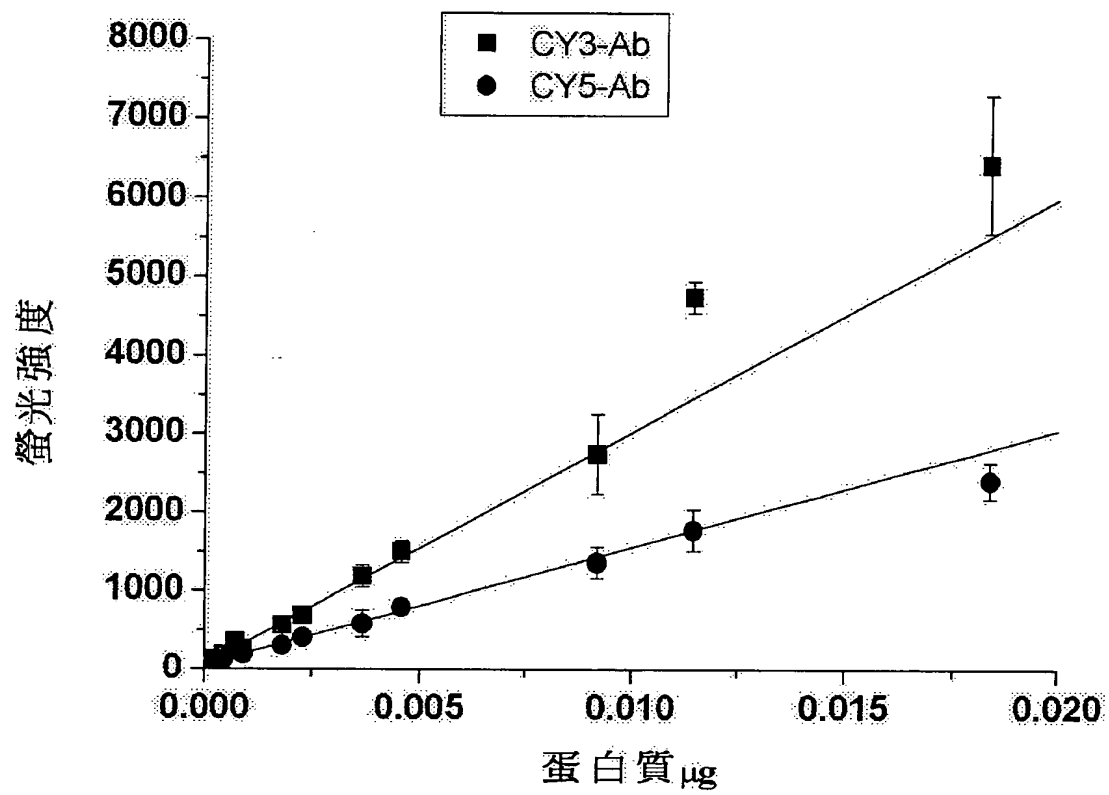


圖 6b

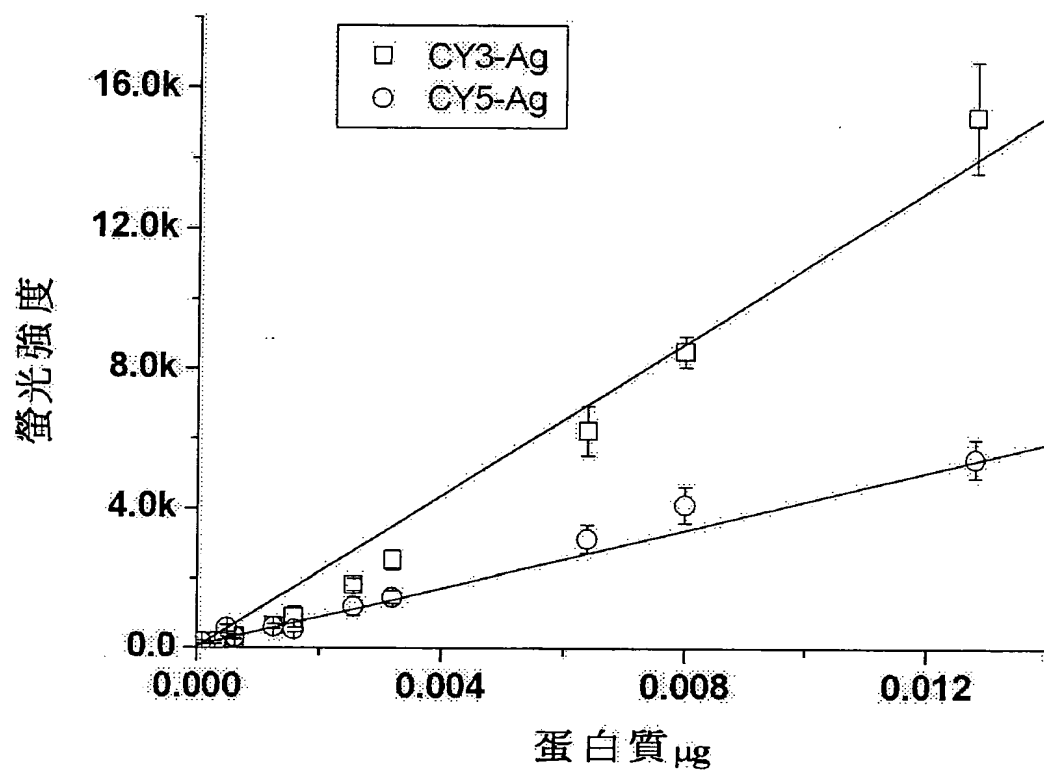
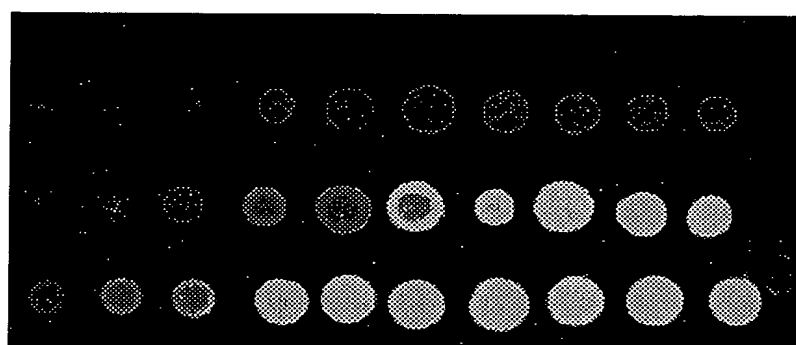


圖 6c



Blank
Control 1
Control 2
+ Ab

圖 7a

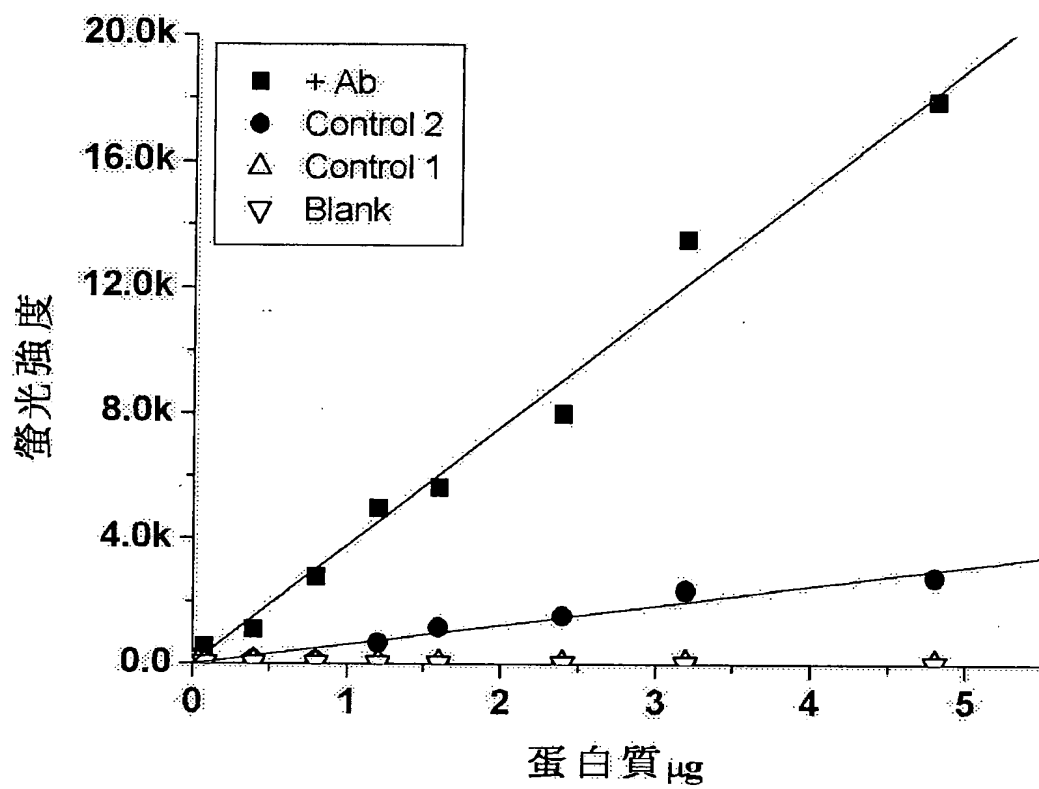


圖 7b

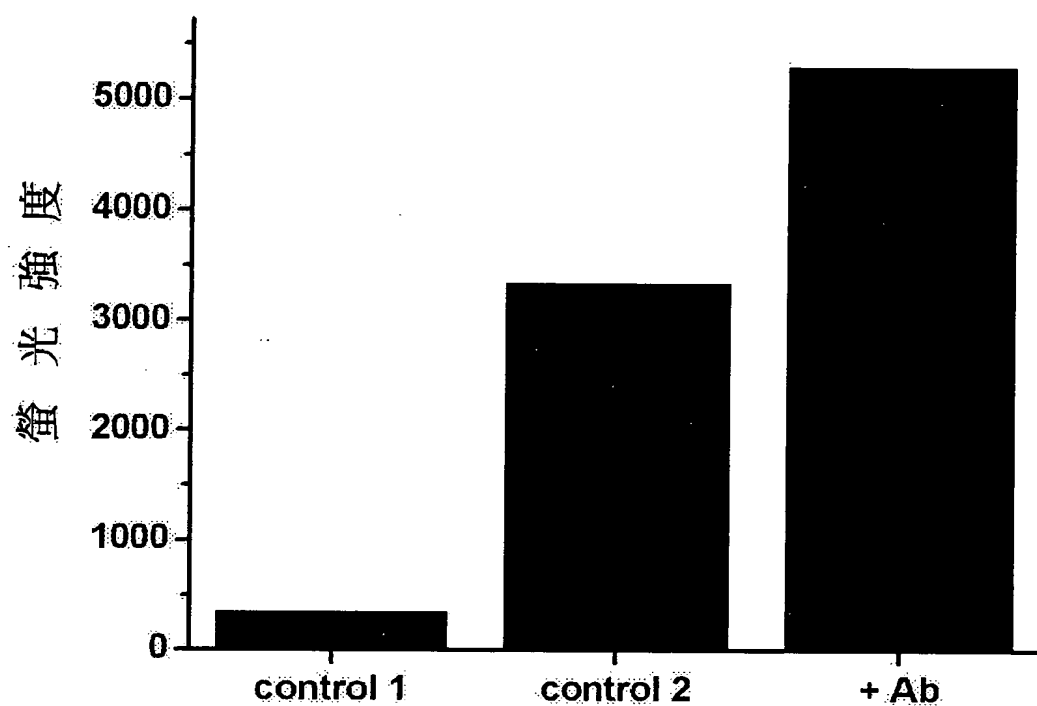
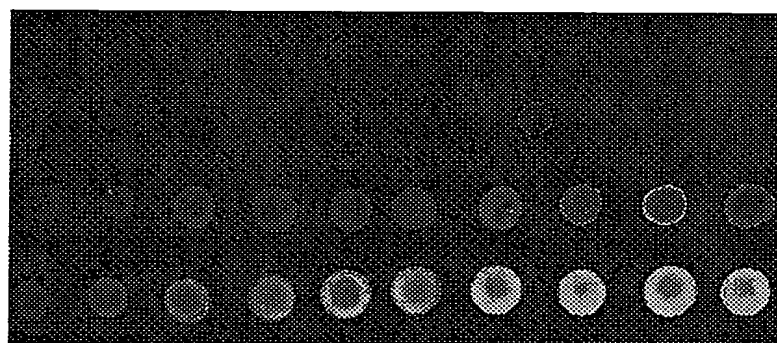


圖 7c



Blank
Control 1
Control 2
+ Ag

圖 8a

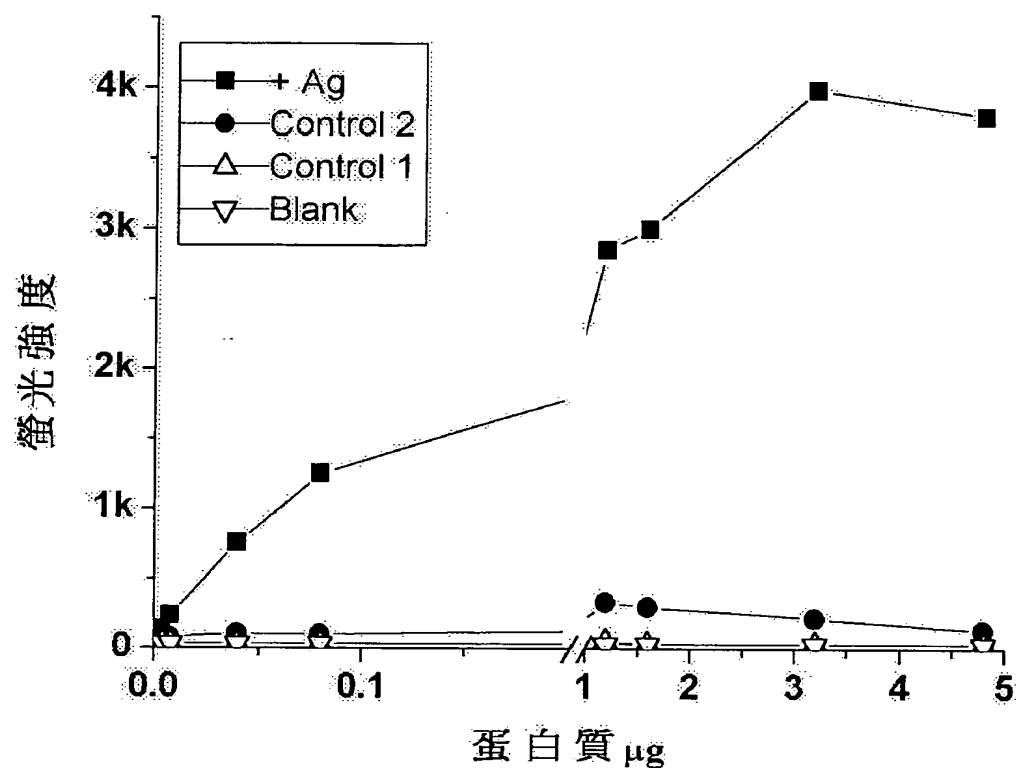
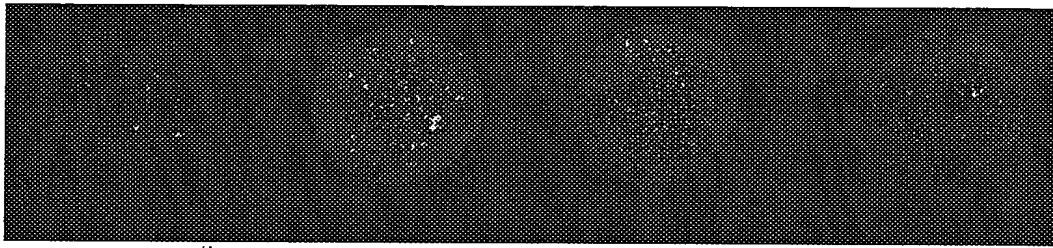


圖 8b



1

2

3

4

圖 9a

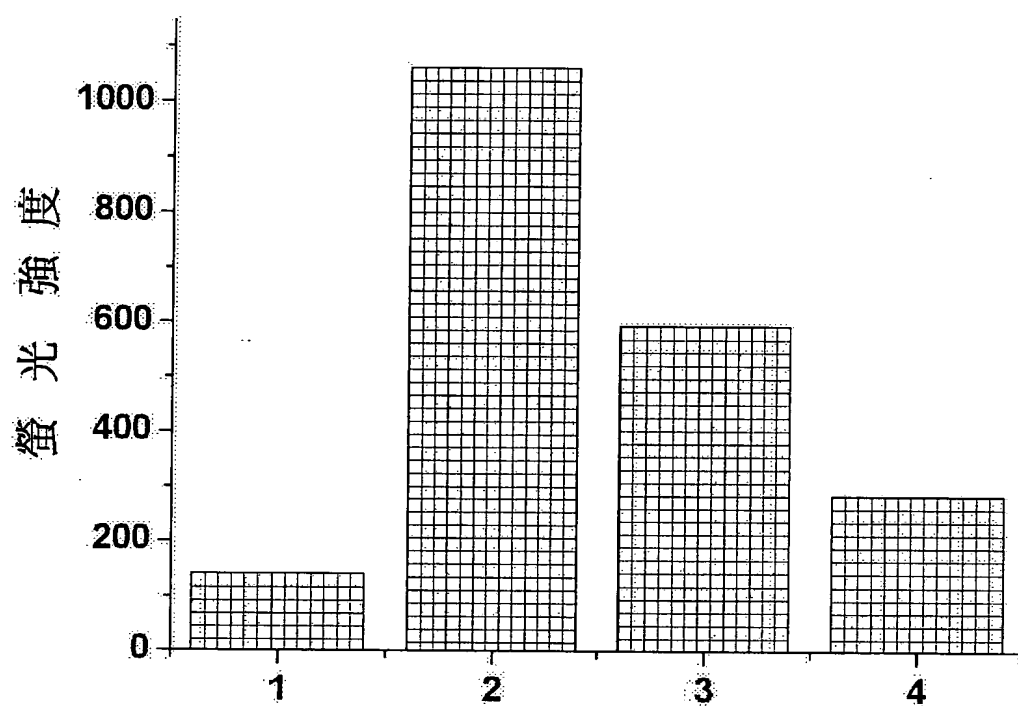


圖 9b

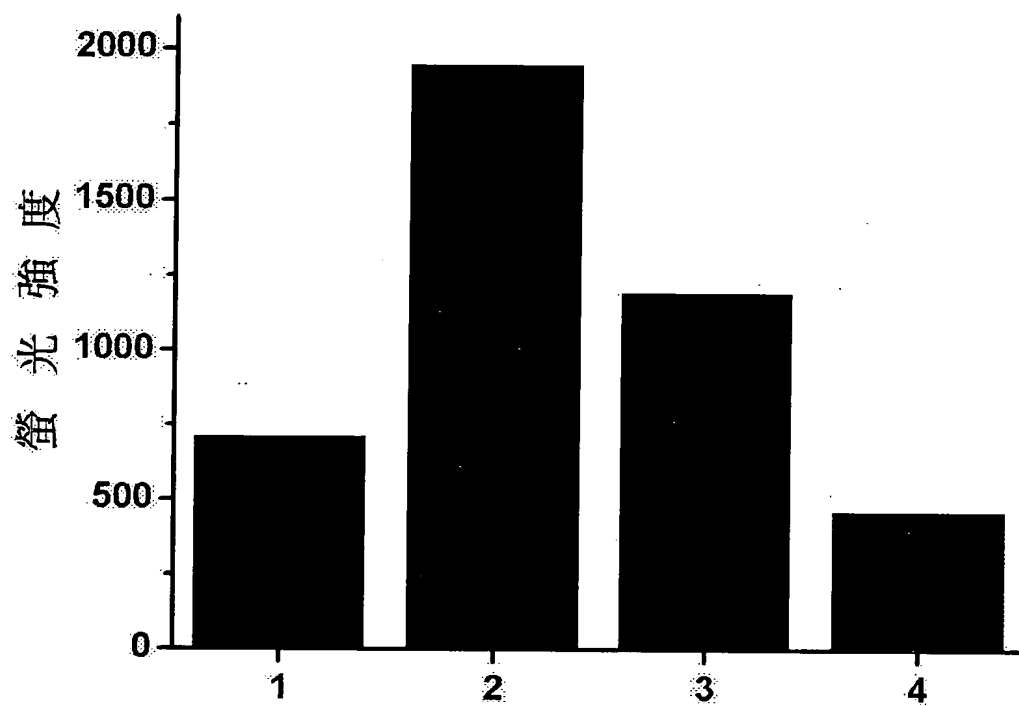


圖 9c